

**AVALIAÇÃO DA G-HESPERIDINA NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS
NO INÍCIO DA ELEVAÇÃO DE PRESSÃO ARTERIAL INDUZIDA POR L-NAME.**

Carolina Martins Lazaro¹, Tiago Tomazini Gonçalves¹, Mário Angelo Claudino¹, Fernanda Bruschi Marinho Priviero ¹.

¹ Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil

Autor correspondente: Carolina Martins Lazaro

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa – Setor de Farmacologia
Cardiovascular

Endereço: Avenida São Francisco de Assis, 218 - Cidade Universitária
Bragança Paulista, São Paulo, Brasil

CEP: 12916-900

E-mail: carolinamakie@gmail.com

RESUMO

A hipertensão arterial é um problema de saúde pública, sendo a disfunção vascular associada a menor biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), substância vasodilatadora que pode reagir com espécies reativas de oxigênio e ter sua atividade prejudicada. Terapias antioxidantes têm sido propostas como alternativa para prevenir danos vasculares associados ao aumento das substâncias pró-oxidantes na hipertensão arterial. Um importante flavonoide e antioxidante é a glicosil hesperidina (GHD), derivado da hesperidina presente em frutas cítricas. O objetivo deste estudo é avaliar *in vivo* o efeito agudo da GHD sobre a reatividade vascular de ratos normotensos no início da administração do inibidor da síntese de NO, o N^ω-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), período no qual a pressão arterial começa a se elevar. Foram utilizados ratos Wistar machos, submetidos à administração de L-NAME (20 mg/rato) durante 24 horas prévias à eutanásia. Em um dos grupos, concomitantemente, foi feita a administração de GHD (75 mg/rato). Após a eutanásia, a artéria mesentérica superior foi removida e preparada em miógrafo para análise das respostas de relaxamento e contração através de curvas concentração-efeito à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio e à fenilefrina, também foram realizadas coleta de sangue e análises plasmáticas de glicose, albumina, uréia, superóxido dismutase e catalase. Como resultado a GHD promoveu melhora no relaxamento dependente do endotélio na presença de L-NAME, por um mecanismo que não está associado à sua atividade antioxidante. Conclui-se que o tratamento com GHD possui potencial positivo como agente preventivo na disfunção vascular relacionada a baixa biodisponibilidade de NO.

Palavras-chave: Glicosil Hesperidina. L-NAME. Hipertensão. Flavonóides. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Hypertension is a public health problem and this vascular dysfunction is associated with less bioavailability of nitric oxide (NO), a vasodilatory substance that can react with reactive oxygen species and have its activity impaired. Thus, has been proposed antioxidant therapies as an alternative to prevent vascular damage associated with the increase of the pro-oxidant substances in hypertension. An important flavonoid and antioxidant is Glycosyl Hesperidin (GHD), derived from hesperidin present in citrus fruits. The aim of this study is to evaluate *in vivo* the acute effect of GHD on the vascular reactivity of normotensive mice at beginning of the NO synthase inhibitor administration, the N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), period which blood pressure begins to rise. Were given to male Wistar rats L-NAME (20 mg / rat) for 24 hours prior to euthanasia. In one group, were given concomitant administration of GHD (75 mg / rat). After euthanasia, the mesenteric artery was removed and prepared in a myograph for analysis of relaxation and contraction responses through acetylcholine, sodium nitroprusside and phenylephrine concentration-effect curves. Plasma samples has been collect for analyzes of glucose, albumin, urea, superoxide dismutase and catalase. As result, GHD promoted endothelium-dependent relaxation improvement in the presence L-NAME, by a mechanism that's not associated with an antioxidant activity. Thus, we concluded that GHD treatment has a positive potential as a preventive agent in vascular dysfunction related to low NO bioavailability.

Keywords: Glycosyl Hesperidin. L-NAME. Hypertension. Flavonoids. Oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), de acordo com as Diretrizes Brasileira de Hipertensão VI – DBH VI, é conceituada como:

[...]condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos – alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010, p. 01).

Porém, a HAS é considerada uma “assassina silenciosa” uma vez que, na maioria dos casos, não há sintomas iniciais de sua ocorrência, levando ao diagnóstico tardio onde os sinais associados a esta patologia surgem somente quando há dano a outros tecidos e órgãos. Assim, o tratamento adequado para controle da pressão arterial e seu diagnóstico precoce é de grande importância para reduzir a ocorrência de tais complicações e, consequentemente, a mortalidade (BORENSTEIN, 1993; KUMAR *et al.*, 2010; NOBRE *et al.*, 2013; O’SHEA *et al.*, 2017).

Atualmente, o tratamento para o controle da pressão arterial se dá através de uso diário e ininterrupto de medicamentos anti-hipertensivos, mudanças na alimentação e no estilo de vida. Em casos onde o tratamento não é adequadamente realizado, aproximadamente metade dos pacientes morre de insuficiência cardíaca congestiva ou acidente vascular encefálico. Assim, a HAS é, portanto, considerada um problema de saúde pública alarmante (KUMAR *et al.*, 2010; SILVA JUNIOR *et al.*, 2016).

Quanto a incidência da doença, conforme pesquisado por GOI *et al.* (2017) em uma publicação da *American Heart Association* de 2015, que informa dados coletados de 2001 a 2011, pode-se notar que a HAS é uma preocupante adversidade, não somente no Brasil, mas em todo mundo, onde ocasiona cerca de 7,5 milhões de óbitos, representando 12,8% do total de mortes por ano. No Brasil, a prevalência exata da hipertensão avaliada por estudos populacionais ainda é considerada precária, porém estudos relatados na DBH VI indicam que, em média, 30% da população adulta apresenta HAS em algum grau, onde mundialmente o Brasil está na sexta colocação entre os países com níveis elevados de mortalidade por doenças cardíacas, infartos e HAS (NOBRE *et al.*, 2013; SIMÃO *et al.*, 2016; GOI *et al.*, 2017).

Apesar de ser uma patologia multifatorial, é importante citar que nos últimos anos, houve evidência crescente da associação entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e o desenvolvimento da HAS, onde o aumento da produção de EROs leva a um desequilíbrio orgânico que tem como consequência o estado de estresse oxidativo, descrito como um dos

principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do dano tecidual, disfunção endotelial e surgimento de diversas patologias (KUMAR *et al.*, 2010; CASTRO, 2010; SILVA e CERCHIARO, 2011; LOPERENA e HARRISON, 2017).

Dentro do contexto da HAS, o estado de estresse oxidativo acarreta em uma superprodução de $O_2^{\bullet-}$ (radical superóxido), molécula que reage com o óxido nítrico (NO) disponível, que como consequência acarreta em sua menor biodisponibilidade. O NO é um importante mediador fisiológico envolvido diretamente no relaxamento e controle do tono vascular, promovendo a diminuição do cálcio intracelular endotelial, o que acarreta em redução na fosforilação da cadeia leve de miosina, favorecendo o relaxamento o musculo liso vascular. Desta forma, possui um papel considerável na proteção do vaso sanguíneo. Assim, quando sua biodisponibilidade se encontra diminuída, pode ocorrer favorecimento do estado contrátil do musculo liso vascular, com consequente aumento da pressão arterial (ZILBERSTEIN e FILHO, 2000; DUSSE *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2010; SILVA e CERCHIARO 2011; GONZALEZ-VICENTE e GARVIN, 2017; LOPERENA e HARRISON, 2017).

Os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (VINCENTINO e SOUSA, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2014). Desta forma, pode ser interessante o uso destas moléculas como agentes preventivos da redução de biodisponibilidade do NO. Neste contexto, os flavonoides são compostos fenólicos amplamente encontrados em frutas e vegetais, constituindo uma importante fonte antioxidante (BARREIROS, 2006; ALVES *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2015).

De forma geral, diversos estudos ao longo dos anos relatam o efeito cardioprotetor dos flavonoides, pois quando colocados na dieta exercem efeitos benéficos em enfermidades cardiovasculares (OLIVEIRA *et al.*, 2006; LUIS e ALLER, 2008; BARBOSA e FERNANDES, 2014; ISKENDER *et al.*, 2017). Estas substâncias existem em ampla variedade nos alimentos, com diversas variações estruturais e potenciais variados, por esta razão, são divididos em diversos grupos. Exemplos a exercer efeitos interessantes vêm do grupo das flavanonas: como a narirutina, a naringina, a neohesperidina e a hesperidina (SIVAM, 2002).

A hesperidina está presente naturalmente em frutas cítricas, principalmente no limão e na laranja (MANTHEY *et al.*, 2001), sendo a ela atribuídas múltiplas atividades biológicas,

tais como anti-inflamatória, antioxidante, vasodilatadora, antiviral, hipolipidêmica, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, entre outras, podendo atuar como “varredora” de radicais livres, moduladora de atividades enzimáticas, e inibindo a proliferação celular. Porém, devido características estruturais que resultam em sua baixa solubilidade, a absorção orgânica da hesperidina é limitada (ROOHBAKHSH *et al.*, 2015; ISKENDER *et al.*, 2017)

Devido a estas circunstâncias, pode ser interessante considerar o uso da Glicosil Hesperidina, ou simplesmente G-Hesperidina (GHD), um derivado solúvel em água da hesperidina, produzida por reação de transglicosilação biotecnológica. A GHD apresenta biologicamente o mesmo perfil metabólico e efeitos da hesperidina, ou seja, possui as mesmas vantagens e propriedades antioxidantes (YAMADA *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2015; OHARA *et al.*, 2016). No entanto, sua solubilidade chega a ser 10 mil vezes maior do que a hesperidina natural, onde estudos de biodisponibilidade em ratos relatam que a concentração plasmática dos metabólitos da hesperidina, após ingestão da GHD, é de 6-7 vezes maior do que quando há administração oral de hesperidina comum. Por esta razão, considera-se que a GHD possui atividade biológica igual ou até mesmo superior à hesperidina, sendo absorvida com maior facilidade, devido à alta solubilidade em água, resultando em maior concentração de seus metabólitos antioxidantes (YAMADA *et al.*, 2006; OHARA *et al.*, 2015; LIPSON, *et al.*, 2015).

Por estas razões é de interesse a análise do uso de GHD na elevação da pressão arterial, uma vez que possui os mesmos efeitos antioxidantes da hesperidina, todavia com maior biodisponibilidade. Assim, este projeto tem como objetivo observar os efeitos antioxidantes e preventivos da ingestão aguda desta substância em ratos, logo no início da elevação da pressão arterial induzido pelo inibidor da síntese de NO, o L-NAME.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, com 7 a 9 semanas de vida, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), os quais ficaram alojados no biotério da Universidade São Francisco (USF – Bragança Paulista - SP) em gaiolas coletivas. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum*. O biotério dispõe de ciclo claro/escuro (12/12 h). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da USF (Protocolo: 001.06.2017 – Versão II; IP. Ciuca: 200.225.122.34; CIAEP/CONCEA No 01.226.2014).

Foram utilizados 18 animais divididos aleatoriamente em 03 grupos: 1) Controle (CTL); 2) L-NAME (LN); 3) L-NAME + G-HESPERIDINA (LN-GHD). O tratamento dos animais ocorreu da seguinte forma: Tratamento do grupo CTL decorreu da administração de soro fisiológico, o grupo LN recebeu L-NAME na concentração de 20 mg/rato, e o grupo LN-GHD recebeu concomitantemente 20 mg/rato de L-NAME e 75 mg/rato de G-Hesperidina. O preparo dos tratamentos ocorreu através da diluição em água dos compostos concentrados, obtendo no final as concentrações mencionadas anteriormente. Os volumes para administração foram de 0,5 ml por rato, através de gavagem. A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após os respectivos tratamentos. A dose de administração do L-NAME (20 mg/rato) está de acordo com estudos prévios (PACCA *et al.*, 2002; PRIVIERO *et al.*, 2007; OLATUNJI *et al.*, 2017) e estudos anteriores realizados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa – Setor de farmacologia cardiovascular (USF), onde este projeto será realizado. A dose escolhida para G-hesperidina foi determinada devido resultados satisfatórios obtidos previamente com a hesperidina, na mesma dose (Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa – setor de farmacologia cardiovascular- USF).

Os animais foram sedados com o anestésico isoflurano e eutanasiados por deslocamento cervical. Após laparotomia, retirou-se amostras de sangue através da punção da aorta abdominal e utilização de tubos com anticoagulante EDTA. A porção torácica da artéria mesentérica superior foi removida, tendo o excesso de tecido gorduroso e conjuntivo retirado, o vaso foi posteriormente dividido em diversos anéis, através de cortes transversais. Após isolado, o material de estudo foi imediatamente acondicionado em solução de *Krebs-Ringer* (composição em mM: NaCl: 118; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5) e utilizados para avaliação funcional das artérias.

O sangue coletado foi posteriormente centrifugado a 3000 RPM por 10 minutos, sendo a porção superior, referente ao plasma, separada em microtubos que foram imediatamente acondicionados em freezer -80C.

2.1 Avaliação da reatividade vascular

Os anéis de mesentérica superior foram montados em miógrafo para órgãos isolados com capacidade de 5 ml por cuba, contendo solução de *Krebs-Ringer*, aquecida a 37°C e aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles fixo e o outro conectado a um transdutor de força. Foi aplicada uma tensão inicial de aproximadamente 10 mN, periodicamente ajustada até que ocorra a estabilização de tensão dos mesmos, durante um período aproximado de 45 a 60 minutos. As alterações de tensão foram medidas por transdutores isométricos e registradas em sistema *PowerLab* de aquisição de dados (*software* versão 7.2, AD Instruments, MA, EUA). A contração da artéria foi avaliada por curvas concentração-efeito a fenilefrina. As respostas de relaxamento para acetilcolina (dependente de endotélio) e nitroprussiato de sódio (independente de endotélio) serão obtidas nos anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com fenilefrina.

2.2 Avaliação da função renal e da função hepática

As funções renal e hepática foram avaliadas pela dosagem dos níveis plasmáticos de ureia e albumina, respectivamente, utilizando kits comerciais (*Labtest*, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os níveis plasmáticos de albumina foram dosados a partir do sistema de desvio de picos de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga na albumina. A amostra foi misturada com o reagente de cor e após 2 minutos foi determinada a absorbância. A cor formada foi medida colorimetricamente em 630 nm, sendo proporcional a concentração de albumina na amostra.

Os níveis plasmáticos de ureia foram dosados a partir do princípio de que a ureia é hidrolisada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono. Os íons de amônia reagem em pH alcalino com o salicilato e o hipoclorito de sódio sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol. A amostra foi misturada com a urease tamponada, incubada a 37°C por 5 minutos. Após, adicionou-se o oxidante de uso e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos. Determinou-se a absorbância em 600nm. A intensidade

de cor formada foi proporcional a quantidade de ureia na amostra. O cálculo de ambos parâmetros foi realizado conforme instruções do fabricante.

2.3 Avaliação do estado oxidativo

Amostras de plasma e kits específicos (*Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA*) foram utilizados para dosagem sanguínea de SOD (superóxido dismutase) e catalase, buscando avaliar a atividade destas enzimas antioxidantes após o tratamento (*in vivo*) dos animais com a G-hesperidina, verificando se este composto teve impacto na produção dos antioxidantes endógenos.

Para dosagem da atividade da enzima SOD, foi empregado um método que utiliza o sal de tetrazólio para detectar os radicais de superóxido gerados da xantina oxidase e da hipoxantina. A xantina oxidase e a hipoxantina produzem radicais superóxido, os quais reagem ao sal tetrazólio e formam compostos vermelho formazan. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade da enzima necessária para a exposição de 50 % da dismutação do radical superóxido. A amostra foi colocada nos poços presentes na placa do kit de dosagem de SOD, juntamente com o detector de radical diluído, em seguida a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi feita a leitura da absorbância em 460 nM.

Para dosagem de catalase, foi utilizada sua função de peroxidase para determinar sua atividade enzimática. O método é baseado na reação da enzima com metanol na presença de peróxido de hidrogênio. O formaldeído produzido foi mensurado de forma calorimétrica com a substância 4-amino-3-hidrazino-5-marcapto-1,2,3-triazol (*purpald*) como cromogênico. O *purpald* forma especificamente um anel heterocíclico duplo com os aldeídos, uma vez que ocorra a oxidação a solução muda de incolor para roxo. A amostra foi colocada nos poços presentes na placa do kit de dosagem de catalase, sendo prontamente seguidas as instruções do fabricante para realização do teste, com leitura de absorbância em 540 nM.

2.4 Avaliação da glicemia

A glicose sanguínea foi determinada através de kit comercial (*Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil*) contendo um reagente único com glicose oxidase, peroxidase, 4-aminoantipirina, fenol, tampão fosfato, azida sódica e surfactantes. O princípio do método consiste na oxidação da glicose presente na amostra através da reação com a enzima glicose oxidase, gerando

peróxido de hidrogênio, o qual reage com o 4-aminoantipirina e com fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, formando uma substância vermelha denominada antipirilquinonimina. Por fim, as amostras foram lidas em 505nm. A intensidade da cor é proporcional a concentração de glicose das amostras e os cálculos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

2.5 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) para os experimentos. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) seguidas de pós-teste de Tukey-Kramer para determinação das diferenças entre os grupos. Foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A acetilcolina (ACh) atua fisiologicamente no endotélio vascular como agonista de receptores muscarínicos na célula endotelial, presente nas artérias e arteríolas. Sua interação, através da formação de segundos mensageiros, promove a liberação de íons de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e eleva os níveis de cálcio intracelular (ZAGO e ZANESCO, 2006; TABATA *et al.*, 2017). A enzima eNOS é ativada na presença desta elevação de Ca^{2+} citoplasmático se fosforilando em *phospho-eNOS*, resultando na produção de NO, o qual se difunde do endotélio para o músculo liso vascular, exercendo ali sua ação vasodilatadora, através do relaxamento muscular (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003; ZAGO e ZANESCO, 2006; TABATA *et al.*, 2017).

Assim, foram realizadas curvas concentração-efeito à ACh, com o objetivo de avaliar a ação moduladora do tratamento agudo com a G-hesperidina sobre o relaxamento vascular dependente do NO proveniente do endotélio vascular. O tratamento agudo de 24 horas com L-NAME promoveu relevante redução do relaxamento induzido pela ACh, produzindo uma diminuição significativa de sua potência ($P < 0,05$). Este resultado é esperado, uma vez que o mecanismo de ação do L-NAME consiste em inibir competitiva e reversivelmente o sítio de ligação da L-arginina (substância precursora do NO) na enzima produtora de NO, reduzindo assim sua produção e levando a um menor relaxamento vascular dependente do endotélio (PINTO *et al.*, 2009). Por outro lado, a administração concomitante de G-Hesperidina preveniu parcialmente a redução do relaxamento causado pelo L-NAME, uma vez que a potência da ACh no grupo L-NAME + GHD foi significativamente maior quando comparado ao grupo tratado apenas com L-NAME, embora tenha sido significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Não houve alteração de resposta máxima em nenhum dos grupos estudados (Figura 1).

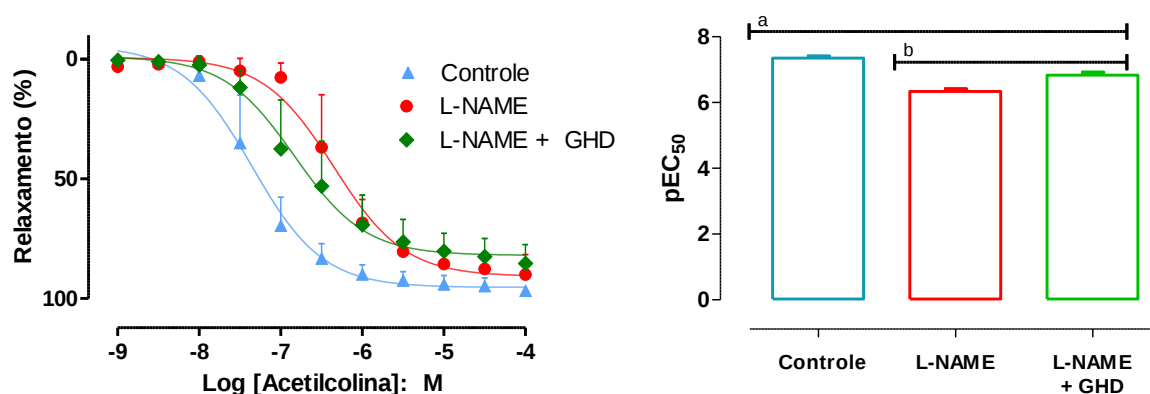


Figura 1. Curva concentração efeito a acetilcolina (painel esquerdo) e potência da acetilcolina (pEC₅₀; painel direito) obtidos em artéria mesentérica superior de animais controles, tratados com L-NAME e L-NAME + GHD. Os dados estão expressos em média $\pm$ E.P.M. a - $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; b - $P < 0,05$ comparado ao grupo L-NAME. ANOVA e Tukey-Kramer ($n = 4\sim 5$).

Nossos dados corroboram com dados prévios que demonstraram que o tratamento com hesperidina melhora o relaxamento vascular dependente do endotélio em ratos espontaneamente hipertensos (DOBIAS *et al.*, 2016). Yamamoto *et al.* (2008) verificou que após a ingestão de G-Hesperidina, a ação de seu metabólito hesperitina leva a um efeito hipotensor em animais espontaneamente hipertensos após 9h e 12h da ingesta. Neste estudo, também foi demonstrado um maior relaxamento induzido pela ACh na artéria aorta dos animais tratados com a G-hesperidina. Similarmente, a ingestão contínua de hesperidina de ratos espontaneamente hipertensos levou à prevenção do desenvolvimento da hipertensão arterial (YAMAMOTO *et al.*, 2013). Em humanos, a ingestão da hesperidina proveniente do suco de laranja em indivíduos saudáveis apontou para mudanças favoráveis na pressão arterial e função endotelial, (MORAND *et al.*, 2011). Em conjunto, estes dados sugerem que este flavonoide possui potencial terapêutico para o controle de disfunção vascular, através da modulação das respostas de relaxamento mediadas pelo NO derivado da célula endotelial.

O relaxamento vascular também foi avaliado através de curvas concentração efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP), substância vasodilatadora que após biotransformação, promove vasodilatação doando espontaneamente uma molécula de NO de forma independente de endotélio e da enzima NOS (KOWALUK *et al.*, 1992). Como esperado, o tratamento com L-NAME não alterou a potência tampouco a resposta máxima do relaxamento induzido pelo SNP na artéria mesentérica, quando comparado ao controle. Por outro lado, inesperadamente, o tratamento com G-hesperidina levou à redução significativa da potência do SNP, sem alteração da resposta máxima, comparado aos grupos controle e L-NAME ($P < 0,001$; Figura 2).

Diferente do que foi observado com a acetilcolina, o tratamento com o antioxidante levou a um prejuízo do relaxamento vascular mediado pelo SNP. Entretanto, nós especulamos que o menor relaxamento tenha ocorrido em função de um prejuízo na biotransformação do NO a partir do SNP, uma vez que os dados de relaxamento da acetilcolina nos indicam que o tratamento com a GHD melhora o relaxamento vascular mediado pelo NO, e o relaxamento mediado pelo SNP na artéria mesentérica dos animais tratados com L-NAME, mostra que o bloqueio agudo da síntese de NO não traz prejuízos para a musculatura vascular lisa.

Embora o mecanismo de biotransformação do SNP em NO não tenha sido completamente elucidado, sabe-se que é necessário que ocorra redução de um elétron da molécula de SNP para que ocorra a liberação posterior de NO e consequente ação vasodilatadora (HARRISON e BATES, 1993). A ação antioxidante da hesperidina ocorre através da doação de elétrons. (RAMIREZ-TORTOZA *et al.*, 2001; MILANI *et al.*, 2012). Desta forma, é possível que esta ação tenha produzido interferência no processo de biotransformação do SNP para conversão do NO, comprometendo sua produção. Acredita-se que este efeito não possui relação direta com ação do NO no musculo liso vascular, uma vez que o resultado encontrado para vasodilatação mediada por estímulos colinérgicos foi satisfatório.

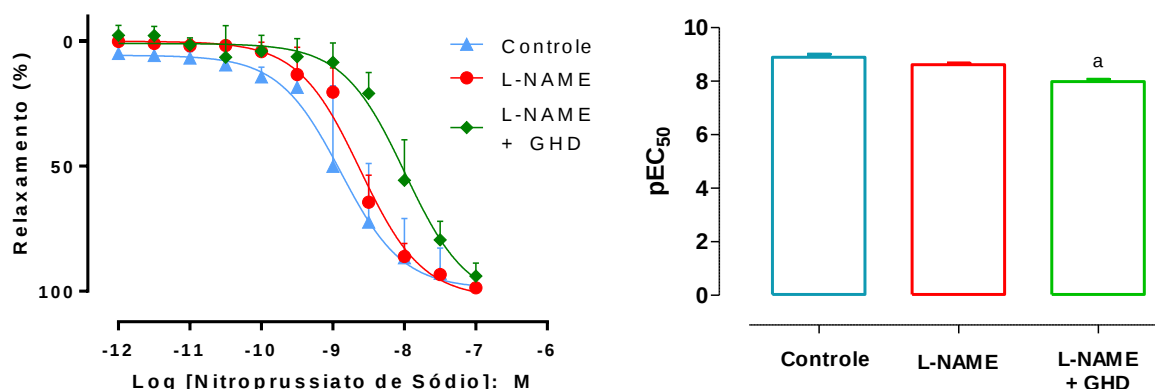


Figura 2. Curva concentração efeito (painel esquerdo) e potência (pEC₅₀; painel direito) do SNP em artéria mesentérica superior de animais controles, tratados com L-NAME e L-NAME + GHD. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. a - $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e ao grupo L-NAME. ANOVA e Tukey-Kramer ($n = 4\sim 5$).

A resposta contrátil da artéria mesentérica foi avaliada através de curvas concentração-efeito a fenilefrina (PE). A figura 3 mostra que não houve alteração de resposta máxima nem

de potência (pEC_{50}) a fenilefrina em nenhum dos grupos estudados.

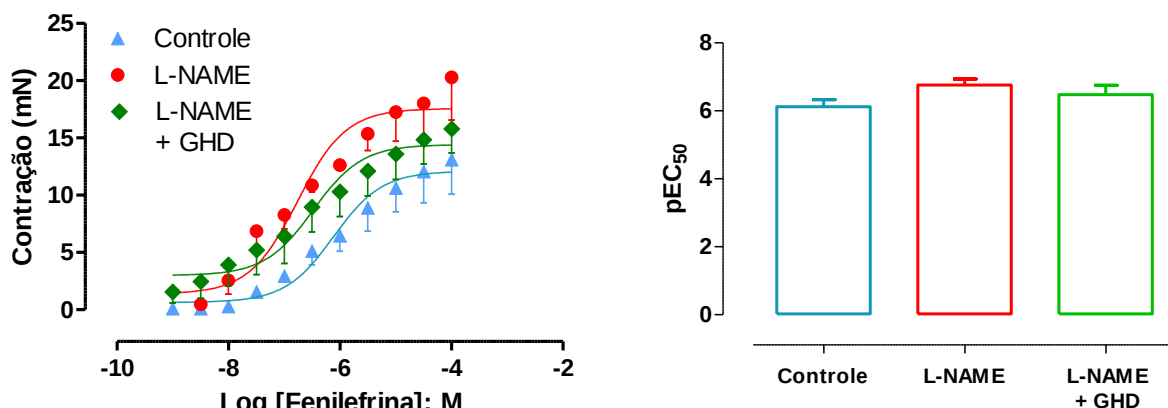


Figura 3. Curva concentração efeito (painel esquerdo) e potência (pEC_{50} ; painel direito) da fenilefrina (PE) em artéria mesentérica de animais controles ou tratados com L-NAME e L-NAME + GHD. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA e Tukey-Kramer ($n = 3\sim 6$).

Para análise complementar foram realizadas dosagens plasmáticas de glicose, buscando verificar se a adição de um radical glicídico à hesperidina produziria alterações nos níveis de glicemia dos animais, no tempo proposto para o tratamento. A glicemia não foi alterada em nenhum dos grupos estudados (figura 4).

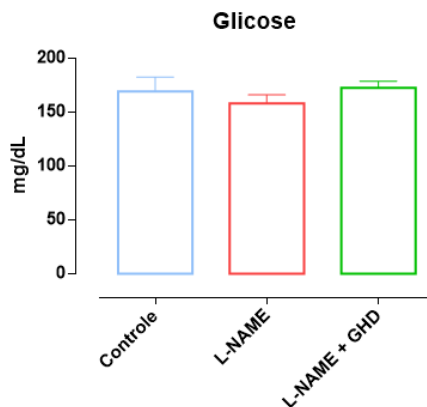


Figura 4. Níveis plasmáticos de glicose em animais controles ou tratados com L-NAME ou L-NAME + GHD. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA e Tukey-Kramer ($n = 6$).

Além disso, avaliamos se o tratamento agudo com G-hesperidina poderia causar alguma alteração da função hepática ou renal. Para tanto foram feitas dosagens de albumina e ureia, respectivamente. Similarmente à glicemia, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados, demonstrando que dentro do período e doses propostas para este estudo nenhum dos tratamentos produziu hepato ou nefrotoxicidade (Figura 5). Estudo prévio demonstra que o tratamento com L-NAME prejudica a função hepática em ratos (SETH *et al.*, 2016). Nós hipotetizamos que o tratamento com a GHD

poderia ter uma ação protetora aos tecidos hepático e renal, uma vez que estudos mostram que os flavonoides apresentam ação hepatoprotetora e nefroprotetora, em diferentes condições patológicas, como por exemplo no câncer (PARI *et al.*, 2015; ZAGHLOUL *et al.*, 2017). Entretanto, todos estes efeitos demonstrados decorreram de tratamentos por um período de tempo maior. Assim, nossos dados indicam que a administração aguda de GHD não traz benefícios ou prejuízos ao tecido hepático ou renal, na ausência de disfunção associada.

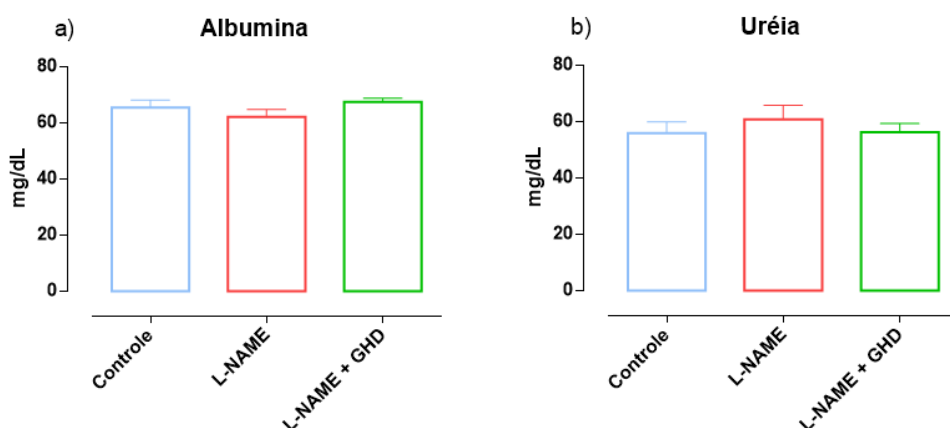


Figura 5. Níveis plasmáticos de albumina (a) e uréia (b) em animais controles ou tratados com L-NAME ou L-NAME + GHD. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA e Tukey-Kramer (n = 6).

O organismo é dotado de uma defesa antioxidante, constituída por enzimas e agentes não enzimáticos (como vitaminas), que neutralizam os radicais livres, evitando suas ações deletérias como dano à membrana celular ou ao DNA. Contudo, em estados patológicos, a defesa antioxidante endógena falha e a produção de radicais livres supera o nível de metabolização, levando ao quadro de estresse oxidativo. A produção de radicais livres é consequência do metabolismo da respiração celular, no qual 5% do O_2 não será convertido em água. Resumidamente, o oxigênio, em razão da sua configuração eletrônica, tem forte tendência a receber um elétron de cada vez. A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental forma o radical, altamente reativo $O_2^{\cdot-}$ (superóxido). Rapidamente ocorre ação da enzima superóxido dismutase – SOD que impede o acúmulo deste radical livre, formando a partir dele o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), composto menos reativo (PAL, 1994; RABÊLO *et al.*, 2010). Porém, quando o H_2O_2 está em grande quantidade, pode reagir com o ferro do organismo, formando o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), composto altamente reativo, capaz de reagir e alterar diversas estruturas celulares que estejam próximas, intervindo sobre enzimas, membranas e ácidos nucleicos. No entanto, com ação das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase, em condições fisiológicas este H_2O_2 pode ser convertido em água (JENKINS, 1988; RABÊLO *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et*

al., 2014). Neste sentido, devido à importante ação dos antioxidantes endógenos, foram determinados os níveis de superóxido dismutase (SOD) e catalase no plasma dos animais tratados.

Nosso estudo mostrou que 24 horas de tratamento com L-NAME, bem como a associação com a GHD, não alterou a atividade das enzimas SOD ou catalase (Figura 6). Entretanto, é interessante observar que há alguma tendência a diminuição da catalase nos animais tratados com L-NAME, que são prevenidas quando o tratamento com a GHD foi associado. Mais estudos são necessários para compreender, à longo prazo, as possíveis alterações destes tratamentos sobre a atividade endógena destas enzimas.

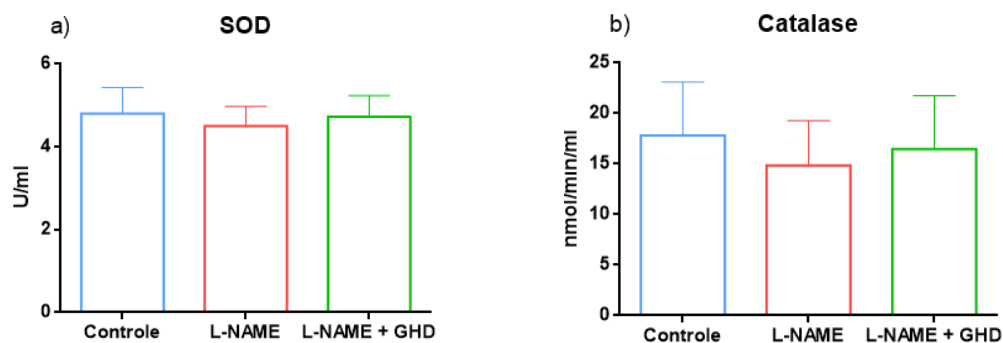


Figura 6. Atividade plasmática das enzimas SOD (a) e catalase (b), em animais controles ou tratados com L-NAME ou L-NAME + GHD. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA e Tukey-Kramer ($n = 6$).

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o tratamento com GHD promove melhora do relaxamento dependente de endotélio na presença do inibidor da síntese de NO, L-NAME, por um mecanismo que não está associado à sua atividade antioxidante. Isto sugere que a GHD pode apresentar uma relevância clínica positiva na prevenção de alterações vasculares associadas ao aumento da pressão arterial.

5 REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. **Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. Diálogos & Ciência — Revista da Rede de Ensino FTC**, v. 5, n. 12, dez. 2007.
- BARBOSA, T. N. R. M.; FERNANDES, C. F. Compostos bioativos e doenças cardiovasculares: Revisando as evidências científicas. **Estudos**, v. 41, p. 181-192, 2014.
- BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BORENSTEIN, M. **Manual de Hipertensão**. Organizadora – Porto Alegre: Editora Sagra Luzzalto, cap. 3, 1993.
- CASTRO, A. F. C. **Stress oxidativo e hipertensão arterial essencial**. 2010. 50 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade do Porto, Porto.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p.417-423, 2002.
- DINIZ, T. C.; SILVA, J. C.; DE LIMA-SARAIVA, S. R.; RIBEIRO, F. P.; PACHECO, A. G.; DE FREITAS, R. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. S.; MENDES, R. L.; ALMEIDA, J. R. The Role of Flavonoids on oxidative stress in epilepsy. **Oxidative Medicine and Cellular longevity**, v. 2015, 2015.
- DOBIAS, L.; PETROVÁ, M.; VOJTKO, R.; KRISTOVÁ, V. Long-term Treatment with Hesperidin Improves Endothelium-dependent Vasodilation in Femoral Artery of Spontaneously Hypertensive Rats: The Involvement of NO-synthase and Kv Channels. **Phytopetarapy Research**, v. 10, p. 1665-1671, 2016.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- GOI, C., B.; SALAMONI, H.; DUARTE SIQUEIRA, F.; SANTOS, F. P.; BENETTI, S. A. W.; PETTENON, P. K. Saúde escolar de adolescentes: incidência e prevalência de hipertensão arterial sistêmica. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 11, n. 2, p804-807, 2017.
- GONZALEZ-VICENTE, A.; GARVIN, J. L. Effects of Reactive Oxygen Species on Tubular Transport along the Nephron. **Antioxidants**, v. 6, n. 2, p. 23, 2017.
- HARRISON, D.G.; JAMES, N.B. The Nitrovasodilators: new ideas about old drugs, **Circulation**, v. 87, n.5 p. 1461-1467, 1993.
- ISKENDER, H.; DOKUMACIOGLU, E.; SEN, T. M.; INCE, I.; KANBAY, Y.; SARAL, S. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF- κ B and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 7, n. 90, p. 500-508, 2017.
- JENKINS, R. R. Free radical chemistry: Relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, n. 3, p. 156-170, 1988.

KOWALUK, E.A.; SETH, P.; FUNG, H.L. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 262, p. 916-922, 1992.

KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N.; MITCHELL R.N. **Robbins & Cotran - patologia básica**. 8ª ed. Elsevier, 2010.

LIPSON, S. M.; OZEN, F. S.; LOUIS, S.; KARTHIKEYAN, L. Comparison of α -glucosyl hesperidin of citrus fruits and epigallocatechin gallate of green tea on the Loss of Rotavirus Infectivity in Cell Culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 29, n. 6 p. 359, 2015.

LOPERENA, R.; HARRISON, D. G. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 169-193, 2017.

LUIS, D. A.; ALLER, R. Papel de los flavonoides del té em la protección cardiovascular. **Anales de Medicina Interna**, v. 25, p. 105-107, 2008.

MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135- 153, 2001.

MILANI, L. I. G.; Terra, N. N.; Fries, L. L. M.; Cichoski, A. J.; Rezer, A. P. S.; Backes, A. M. P.; Parodia, C. G. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki L.*) cultivar Rama Forte. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 118-124, 2012.

MORAND, C.; DUBRAY, C.; MILENKOVIC, D.; LIOGER, D.; MARTIN, J. F.; SCALBERT, A.; MAZUR, A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, p. 73-80, 2011.

NOBRE, F. COELHO, E. B.; LOPES, P. C.; GELEILETE, T. J. M. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 46, n. 3, p. 256-72, 2013.

OHARA, T.; MUROYAMA, K.; YAMAMOTO, Y.; MUROSAKI, S. A combination of glucosyl hesperidin and caffeine exhibits an anti-obesity effect by inhibition of hepatic lipogenesis in mice. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 2, p. 310-6, 2015.

OHARA, T.; MUROYAMA, K.; YAMAMOTO, Y.; MUROSAKI, S. Oral intake of a combination of glucosyl hesperidin and caffeine elicits an anti-obesity effect in healthy, moderately obese subjects: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 6, 2016.

OLIVEIRA, V. P.; ESPESCHIT, A. C. R.; PELUZIO, M. C. G. Flavonóides e doenças cardiovasculares: Ação antioxidante. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 16, p. 234-8, 2006.

O'SHEA, P. M.; GRIFFIN, T. P.; FITZGIBBON, M. Hypertension: The role of biochemistry in the diagnosis and management. **Clinica Chimica Acta**, v. 465, p. 131-143, 2017.

PACCA, S. R.; DE AZEVEDO, A. P.; DE OLIVEIRA, C.F; et al. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor

blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 39, n.2, p. 201-207, 2002.

PAL, Y. B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n.1, p. 139-162, 1994.

PARI, L.; KARTHIKEYAN, A.; KARTHIKA, P.; RATHINAM, A. Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 46-55, 2015.

PINTO, P. C.; FELIZ, T.; RODRIGUES, L. M. Acerca do impacto da administração transdérmica de um inibidor da NO-sintetase (L-NAME) – uma abordagem preliminar. **Rev. Lusófona de Ciências e Tecnológica da Saúde**, v. 2, p. 246-252, 2009.

PRIVIERO, F. B.; TEIXEIRA, C. E.; CLAUDINO, M. A.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. **European Journal of Pharmacology**, v. 571, n. 2-3, p. 189-196, 2007.

RABÊLO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como alvo terapêutico no manejo cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 94, p. 684-693, 2010.

RAMIREZ-TORTOZA, C.; ANDERSEN, O. M.; GARDNER, P. T.; MORRICE, P. C.; WOOD, S. G.; DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 31, n. 8, p. 1033-1037, 2001.

ROOHBAKHSH, A.; PARHIZ, H.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. **Life Sciences**, v. 124, p. 64-74, 2015.

SETH, M.K.; HUSSAIN, M.E.; PASHA, S.; FAHIM, M. Effects of a novel ACE inhibitor, 3-(3-thienyl)-l-alanyl-ornithyl-proline, on endothelial vasodilation and hepatotoxicity in l-NAME-induced hypertensive rats. **Drug Des Devel Ther**, v.10, p. 1533-24, 2016.

SILVA, D.C.; CERCHIARO, G. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova*, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

SILVA JUNIOR, N. D.; SANTOS, G. G. Efeitos induzidos pelo treinamento de força: Revisão sobre as alterações fisiológicas em indivíduos hipertensos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 2, p. 107-114, 2016.

SIMÃO, R.; AGRELA, M.; FRASSEI, J.; MIDDLEJ-BRITO, T.; LEMOS, P.; BORTOLotto, L. Hipertensão Arterial Sistêmica. **Revista de Medicina**, v. 95, n. 1, 37-38, 2016.

SIVAM, G. Analysis of flavonoids. In: HURST, W. J. (ed.). **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA – SBC. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão**, v. 1, p. 1-40, 2010.

TABATA, K.; KOMORI, K.; OTSUKA, R.; KAJIKURI, J.; ITOH, T. Enhancement of Nitric Oxide Production Is Responsible for Minimal Intimal Hyperplasia of Autogenous Rabbit Arterial Grafts. **Circulation Journal**, 2017.

VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-9, 2014.

VINCENTINO, A. R. R.; SOUSA, F. M.; Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 384-387, 2007.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N.; MITSUZUMI, H.; MIWA, Y.; KUBOTA, M.; CHAEN, H.; KIBATA, M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006.

YAMAMOTO, M.; JOKURA, H.; HASHIZUME, K.; OMINAMI, H.; SHIBUYA, Y.; SUZUKI, A.; HASE, T.; SHIMOTOYODOME, A. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. **Food and Function**, v. 4, n. 9, p. 1346-1351, 2013.

YAMAMOTO, M.; JOKURA, H.; SUZUKI, A.; HASE, T.; SHIMOTOYODOME, A. Effects of continuous ingestion of hesperidin and glucosyl hesperidin on vascular gene expression in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 59, n. 5, p. 470-3, 2013.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, A.; HASE, T. Short- term effect of glucosyl hesperidin and hesperitina on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology** v. 54, p. 95-98, 2008.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido Nítrico, doenças cardiovasculares e exercícios físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264 –e270, 2006.

ZAGHLOUL, R.A.; ELSHERBINY, N.M.; KENAWY, H.I.; EL-KAREF, A.; EISSA, L.A.; EL-SHISHTAWY, M.M. Hepatoprotective effect of hesperidin in hepatocellular carcinoma: Involvement of Wnt signaling pathways. **Life Sci**, v. 185, p. 114-125, 2017.

ZILBERSTEIN, B.; FILHO, F. R. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-71, 2000.